

The effect of medium compounds on hairy root induction in chicory (*Cichorium intybus* L.) and enhancement of secondary metabolites

Mehdi Mohebodini 

*Associate Professor, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran. Email: mohebodini@uma.ac.ir

Roghayeh Fathi 

Phd student, Department of Horticultural science, Faculty of Agriculture and Natural resources, University of Mohaghegh Ardabili, Iran. Email: fathi.r@uma.ac.ir

Abstract

Objective

Chicory (*Cichorium intybus* L.) is an important medicinal plant from Asteraceae family; contain a number of valuable medicinal compounds. Hairy root induction by *Agrobacterium rhizogenes* are an effective method for production of secondary metabolites.

Materials and methods

In this study, through first experiment, different concentrations of macro elements (0.5x, 1x, 1.5x, 2x, 2.5x and 3x concentrations of MS base medium) were investigated. In second experiment inoculation time was examined to establish an efficient transformation system for chicory. Molecular confirmation of transgenic hairy roots was done with PCR using gene-specific primers for *rolB* gene and also growth rate of hairy root lines obtained from different explants were investigated. Also the effect of hormonal elicitor and carbon source were studied in hairy roots growth.

Results

The results show that maximum chicory hairy roots induction was observed by using 1x KNO₃, 1.5x NH₄NO₃, 1x and 1.5x MgSO₄, 1.5x CaCl₂ and 0.5x KH₂PO₄ (45.66, 53.33, 46.66, 53.33 and 66.66). The highest phenolic content was obtained by using 1x KNO₃,

2x NH₄NO₃, 1.5x MgSO₄, 1.5x CaCl₂ and 0.5x KH₂PO₄ (4.21, 4.33, 4.6, 4.58 and 4.84). Also 1.5x KNO₃, 2x NH₄NO₃, 1x MgSO₄, 1.5 CaCl₂ and 0.5x KH₂PO₄ showed maximum flavonoid content (17.25, 18.52, 17.22, 18.3, 17.96 mg g DW respectively). The observation confirmed that growth of hairy root lines were significantly different and Line C showed higher biomass (0.36 g). Also the results of experiments revealed that 1.5 mg l⁻¹ NAA in combination with 3 and 4% sucrose were superior for highest fresh (1.96 and 1.72 g) weight.

Conclusions

Hairy roots culture was developed as the innovative path for bulky production of secondary metabolites which find relevance in the pharmaceutical, food and flavor industries. The results indicated significant increases in hairy root induction and total metabolites content by ATCC15834 strain and 0.5x KH₂PO₄ co-culture MS medium.

Keywords: Inoculation, KH₂PO₄, Medium, Phenolic, RolB gene.

Citation: Mohebodini M, Fathi R (2020) The effect of medium compounds on hairy root induction in chicory (*cichorium intybus* L.) and enhancement of secondary metabolites. *Agricultural Biotechnology Journal* 12 (3), 67-90.

Agricultural Biotechnology Journal 12 (3), 67-90.

DOI: 10.22103/jab.2020.15606.1215

Received: July 2, 2019; Accepted: August 16, 2020

© Faculty of Agriculture and Technology Institute of Plant Production, Shahid Bahonar University of Kerman-Iranian Biotechnology Society

تأثیر ترکیبات محیط کشت بر القای ریشه‌های مویین در کاسنی (*Cichorium intybus* L.) و افزایش متابولیت‌های ثانویه

مه‌دی محب‌الدینی

*نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم باغبانی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران، ایمیل:

mohebodini@uma.ac.ir

رقیه فت‌حی

دانشجوی دکتری، گروه علوم باغبانی، دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی، دانشگاه محقق اردبیلی، ایران، ایمیل:

fathi.r@uma.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۱۱، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۵/۲۶

چکیده

هدف: کاسنی گیاه دارویی مهمی از خانواده‌ی گل‌ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) بوده و دارای ترکیبات دارویی ارزشمندی می‌باشد. القای ریشه‌های مویین با استفاده از *Agrobacterium rhizogenes* یکی از روش‌های کاربردی برای افزایش بیوسنتز متابولیت‌های ثانویه می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این تحقیق، در آزمایش اول، تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر ماکرو محیط کشت بر کارایی القای ریشه‌های مویین در کاسنی بررسی شد. تأیید مولکولی ریشه‌های مویین به وسیله‌ی PCR با استفاده از آغازگرهای اختصاصی ژن *rolB* انجام شد. در آزمایش دوم میزان رشد لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین کاسنی بررسی شد و همچنین تأثیر الیسی‌تور هورمونی و منبع کربن و بر رشد ریشه‌های مویین بررسی شد.

نتایج: نتایج به‌دست آمده نشان داد که بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین در غلظت ۱X پتاسیم نیترات، ۱/۵X نیترات آمونیوم، ۱X و ۱/۵X منیزیم سولفات، ۱/۵X کلسیم کلرید و ۰/۵X پتاسیم فسفات (به‌ترتیب ۴۶/۶۶، ۵۳/۳۳، ۴۶/۶۶ و ۵۳/۳۳) و ۶۶/۶۶ درصد) مشاهده شد. بیشترین میزان فنول کل در غلظت ۱X پتاسیم نیترات، ۲X نیترات آمونیوم، ۱/۵X منیزیم سولفات، ۱/۵X کلسیم کلرید و ۰/۵X پتاسیم فسفات (به‌ترتیب ۴/۲۱، ۴/۳۳، ۴/۲۶ و ۴/۵۸) و ۴/۸۴ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) به‌دست آمد.

غلظت ۱/۵X پتاسیم نترات، ۲X نترات آمونیوم، ۱X منیزیم سولفات، ۱/۵X کلسیم کلرید و ۰/۵X پتاسیم فسفات بالاترین میزان فلاونوئید را داشتند (به ترتیب ۱۷/۲۵، ۱۸/۵۲، ۱۷/۲۲، ۱۸/۳ و ۱۷/۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک). لاین C بیشترین افزایش زیست‌توده (۰/۳۶ گرم) را نشان دادند همچنین بیشترین وزن تر (۱/۹۶ و ۱/۷۲ گرم در فلاسک) به ترتیب در ریشه‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد و ۴ درصد ساکارز به دست آمد.

نتیجه‌گیری: کشت ریشه‌های مویین یک فرآیند نوین برای تولید متابولیت‌های ثانویه در سطح وسیع است که قابل استفاده در صنایع داروسازی و غذایی می‌باشد. نتایج این پژوهش نشان داد که استفاده از سویه‌ی ATCC15834 و محیط هم‌کشتی حاوی KH_2PO_4 ۰/۵ X باعث افزایش میزان القای ریشه‌های مویین و متابولیت‌های گیاه کاسنی شد.

کلمات کلیدی: تلقیح، پتاسیم فسفات، ژن *rolB*، فنول، محیط کشت.

مقدمه

گیاهان دارویی به علت داشتن ترکیبات دارویی متنوع مورد توجه همه‌ی جوامع هستند (Pereira et al. 2019). جمع‌آوری یا کشت گیاهان دارویی نیازمند زمانی طولانی است و دارای محدودیت‌های گوناگون می‌باشد. به همین دلیل در سال‌های اخیر تلاش‌های زیادی برای ایجاد روش‌های جایگزین برای تولید ترکیبات دارویی گیاهی انجام شده است. کشت بافت گیاهی روش مناسب و راهگشایی برای تولید متابولیت‌های گیاهی است (Tripathi et al. 2019). استفاده از کشت سلول‌های گیاهی به علت بی‌ثباتی در تولید، کارایی کمتری در تولید متابولیت‌های ثانویه دارد همچنین تولید برخی متابولیت‌ها فقط در اندام‌های تمایز یافته تولید می‌شوند. تولید ریشه‌های مویین حاصل از تلقیح گیاه با *Agrobacterium rhizogenes* روش کارآمد و مؤثری برای تولید متابولیت‌های ثانویه با ثبات بیوشیمیایی و ژنتیکی می‌باشند (Singh et al. 2018). ریشه‌های دست آمده می‌توانند منبع مناسب و ارزشمندی جهت تولید ترکیبات شیمیایی گیاهی در مقیاس وسیع، آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و گیاه پالایی به شمار آیند (Kumar et al. 2006). از ویژگی‌های ریشه‌های مویین می‌توان به رشد سریع و پلاژیوتروپیک، ثبات ژنتیکی، توانایی رشد و تولید زیست‌توده‌ی فراوان بدون نیاز به تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی و تولید متابولیت‌های ثانویه‌ی گیاهی با سرعت و مقدار بیشتر اشاره کرد (Kabirnetaj et al. 2012). همچنین در سال‌های اخیر از روش تولید DNA نوترکیب و تولید پروتئین‌های انسانی از طریق انتقال ژن با *Agrobacterium* برای تولید ترکیبات دارویی استفاده می‌شوند (Elkin et al. 2012). کاسنی از اعضای خانواده‌ی گل‌ستاره‌ای‌ها (Asteraceae) و گیاهی یک ساله یا دو ساله دارای گل‌های آبی یا سفید رنگ و برگ‌های تقریباً گرد با بریدگی‌هایی در کناره‌ها می‌باشد. این گیاه دارای ترکیبات متعدد از جمله اینولین، کومارین‌ها، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، شیکوریک‌اسید و سزکوئی‌ترین‌لاکتون‌ها است و در درمان بیماری‌های کبدی، کلیه و فشارخون بالا نقش

دارد (Saeed et al. 2017). ترکیبات فنولی موجود در کاسنی خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی داشته و در جلوگیری از سرطان‌ها مؤثر است (Degl innocenti et al. 2008). گیاهان در شرایط تنش، ترکیبات ثانویه گیاهی از جمله فنول و فلاونوئید تولید می‌کنند (Conforti et al. 2009). شیکوریک اسید از مشتقات فنول بوده و از جمله اثرات آن می‌توان به اثر ضددیابتی، ضد ایدزی، ضد آنزیم هیالورونیداز اشاره کرد. از این ترکیب در تولید داروهای ضد ایدز استفاده می‌شود زیرا مانع بیان ژن ویروس HIV در بدن انسان می‌شود. همچنین باعث افزایش تولید انسولین شده و در مهار علائم دیابت نقش دارد. اینولین موجود در کاسنی به علت داشتن قند طبیعی، برای مصرف افراد دیابتی مناسب بوده و همچنین در بهبود جذب کلسیم و منیزیم نقش دارد (Pereira et al. 2019). تحقیقات اندکی بر روی بهینه‌سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های موپین در گیاه کاسنی انجام شده است. در پژوهشی تأثیر سویه‌های مختلف *A. rhizogenes* و محیط هم‌کشتی MS (Murashige and Skoog 1962)، LS (Linsmaier and Skoog 1965) و B5 (Gamborg et al. 1968) را بر القای ریشه‌های موپین در ریزنمونه‌ی کوتیلدون هشت روزه‌ی کاسنی بررسی کردند و گزارش کردند که سویه‌ی A13 در محیط کشت MS بیشترین کارایی را در القای ریشه‌های موپین در ریزنمونه‌های کوتیلدونی هشت روزه داشته‌اند (Kabirnetaj et al. 2012). در پژوهش دیگری میزان رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در دودمان‌های مختلف ریشه‌های موپین حاصل از تلقیح برگ‌های چهار هفته‌ای کاسنی با سویه‌ی A4، بررسی شد و نتایج نشان داد که دودمان‌های مختلف ریشه‌های موپین که هر کدام از یک سلول تراریخت حاصل شده است تفاوت معنی‌داری از لحاظ توانایی رشد و تولید متابولیت ثانویه نسبت به یکدیگر دارند (Azarmehr et al. 2013). در پژوهشی تأثیر تنظیم‌کننده‌های رشد گیاهی به‌عنوان محرک رشد ریشه‌های موپین گیاه کاسنی، مثبت و مؤثر ارزیابی شده و توانایی جذب هورمون توسط ریشه‌های موپین تراریخت را بیشتر از ریشه‌های غیر تراریخت گزارش شد (Fathi et al. 2018). به‌طور معمول، القای ریشه‌های موپین در گیاه کاسنی با استفاده از سویه‌ی ATCC15834 دشوار و با درصد پایین القای ریشه در ریزنمونه‌ها همراه است (Kabirnetaj et al. 2012). به‌همین منظور، در تحقیق حاضر، بهینه‌سازی القا و کشت ریشه‌های موپین از طریق بررسی تأثیر نوع ریزنمونه و مدت هم‌کشتی بر القای ریشه بررسی گردید. همچنین تأثیر مدت آلوده‌سازی گیاه با باکتری و نوع محیط هم‌کشتی مورد بررسی قرار گرفت. در مرحله‌ی بعد، لاین‌های مختلف ریشه‌های موپین از لحاظ میزان رشد و تولید زیست توده بررسی شدند. ترکیبات محیط کشت از عوامل تأثیرگذار در بهینه‌سازی القا و رشد ریشه‌های موپین است. در پژوهشی تأثیر محیط هم‌کشتی را بر القای ریشه موپین در زرین گیاه مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که استفاده از MS فاقد NH_4NO_3 ، KNO_3 ، KH_2PO_4 و CaCl_2 به‌عنوان محیط هم‌کشتی منجر به افزایش راندمان القای ریشه‌های موپین در این گیاه شد (Sharafi et al. 2014). همچنین حذف CaCl_2 از محیط کشت MS باعث افزایش تولید ریشه‌های موپین در گیاه Hevea brasiliensis گردید (Montoro et al. 2000). در پژوهشی نیز تأثیر مثبت حذف ترکیبات معدنی از محیط کشت در افزایش

کارایی *A. rhizogenes* در تراریخته سازی گیاه *Ginkgo biloba* تأیید شد (Dupre et al. 2000). بسته به نوع گیاه، وجود یا عدم حضور یون‌ها در محیط هم‌کشتی باکتری و گیاه، تأثیر مستقیم در میزان تراریخته‌سازی گیاه دارد (Aycan et al. 2019). برخی پژوهشگران تأثیر منفی Ca^{+2} و برخی دیگر تأثیر منفی PO_4 را در القای ریشه‌های موپین گزارش کرده‌اند (Sharafi et al. 2014). در بررسی اثر متقابل محیط هم‌کشتی و سویه بر فراوانی ریشه موپین، بالاترین فراوانی القای ریشه را مربوط به محیط MS حاوی ۶ درصد ساکارز و سویه A4 دانستند (Moradi et al. 2019). در پژوهشی که با هدف بررسی تأثیر عناصر محیط کشت بر القای ریشه‌های موپین با استفاده از سویه A_4 از *A. rhizogenes* در کاسنی انجام شد پژوهشگران دریافتند که حذف KNO_3 از محیط هم‌کشتی تأثیر مثبتی در افزایش درصد القای ریشه‌های موپین شد (Fathi et al. 2019). اما تا به حال تأثیر غلظت‌های مختلف عناصر ماکرو محیط کشت بر میزان القای ریشه‌های موپین و تولید متابولیت‌های ثانویه بررسی نشده است و این اولین پژوهش در این زمینه می‌باشد.

مواد و روش‌ها

تأثیر ترکیبات محیط کشت بر القای ریشه‌های موپین: بذور کاسنی به منظور استریل شدن به مدت ۱ دقیقه در اتانول ۷۰ درصد و بلافاصله با آب شستشو داده شد. سپس ۲۵ دقیقه در هیپوکلریت سدیم پنج درصد قرار گرفتند. در نهایت سه بار در آب مقطر استریل شستشو داده شده و در محیط کشت MS کشت شدند. داخل هر شیشه ۲۰ عدد بذر کشت گردید و در اتاقک رشد با دمای 25 ± 2 درجه سانتی‌گراد و فتوپریود ۸:۱۶ نگهداری شدند. در این آزمایش، باکتری *A. rhizogenes* سویه ATCC15834، در محیط کشت LB مایع حاوی ۵۰ میلی‌گرم بر لیتر آنتی‌بیوتیک ریفاپمپسین کشت شد و به مدت ۲۴ ساعت در شیکر انکوباتور (فن‌آوران سهند) با دمای ۲۸ درجه‌ی سانتی‌گراد و ۱۰۰ rpm نگهداری شد. غلظت سوسپانسیون باکتریایی بین ۰/۷ تا ۰/۸ در OD600 تنظیم شد. این باکتری برای آلوده نمودن گیاه کاسنی مورد استفاده قرار گرفت. سویه‌ی مزبور از مرکز ملی مهندسی ژنتیک تهیه شد. ریزنمونه‌ها پس از زخم شدن سطحی توسط اسکالپل، در شرایط استریل در سوسپانسیون باکتری به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شده و در شیکرانکوباتور با دمای ۲۵ درجه‌ی سانتی‌گراد و دور ۱۲۰ rpm تکان داده شدند. ریزنمونه‌های تلقیح شده، در روی کاغذ صافی برای حذف باکتری اضافی، نسبتاً خشک گردید و سپس روی محیط کشت MS جامد حاوی نترات پتاسیم (KNO_3)، نترات آمونیوم (NH_4NO_3)، پتاسیم فسفات (KH_2PO_4)، منیزیم سولفات ($MgSO_4$) و کلسیم کلرید ($CaCl_2$) در غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ برابر میزان آن‌ها در محیط کشت MS منتقل شدند و در دمای 25 ± 2 درجه‌ی سانتی‌گراد و در شرایط تاریکی نگهداری شدند. ریزنمونه‌های تلقیح نشده نیز به عنوان شاهد در شرایطی مشابه در محیط کشت LB بدون باکتری به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شده. پس از سپری شدن مدت ۴ روز، ریز

نمونه‌ها در آب استریل حاوی ۲۵۰ میلی‌گرم در لیتر سفوتاکسیم شستشو داده شدند و پس از خشک شدن نسبی در روی کاغذ صافی، به محیط کشت MS جامد حاوی ۵۰۰ میلی‌گرم در لیتر آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم انتقال داده شدند. پس از چهار هفته، درصد القای ریشه‌ی مویین، میانگین تعداد ریشه‌ها، میزان فنول و فلاونوئید کل اندازه‌گیری شد.

تهیه عصاره پلی‌فنلی و اندازه‌گیری فنل و فلاونوئید: برای این منظور ابتدا مقدار ۲ گرم از بافت ریشه‌های

مویین در ۳۰ میلی‌لیتر اتانول ۷۰ درصد و فرمیک اسید به نسبت ۹۹:۱ سائیده شد و سپس عصاره‌ی به دست آمده برای اندازه‌گیری فنول و فلاونوئید استفاده گردید. برای سنجش فنل کل از روش Sonald and Laima (2001) استفاده شد. ۵۰۰ میکرولیتر عصاره‌ی پلی‌فنلی و ۰/۵ میلی‌لیتر اتانول ۹۵ درصد مخلوط شد سپس ۲۵۰ میکرولیتر معرف فولین ۱۰ برابر رقیق شده و ۵۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم به آن اضافه گردید. پس از افزودن ۳ میلی‌لیتر آب مقطر و نگهداری محلول در شرایط تاریکی به مدت ۹۰ دقیقه، میزان جذب در طول موج ۷۲۵ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد. از منحنی استاندارد گالیک اسید برای محاسبه‌ی فنول کل استفاده گردید. برای سنجش فلاونوئید کل نیز از روش Heimler et al. (2009) استفاده شد. برای سنجش فلاونوئید کل ۰/۲۵ میلی‌لیتر عصاره پلی‌فنلی، ۷۵ میکرولیتر سدیم نترات ۵ درصد، ۷۵ میکرولیتر محلول تازه تهیه شده آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد و ۰/۵ میلی‌لیتر محلول سدیم هیدروکساید ۱ مولار با هم مخلوط شد و سرانجام حجم نهایی محلول با استفاده از آب دو بار تقطیر به ۲/۵ میلی‌لیتر رسانده شد. بعد از ۵ دقیقه جذب آنها در طول موج ۵۱۰ نانومتر با استفاده از اسپکتروفوتومتر خوانده شد. مقدار فلاونوئید کل با استفاده از منحنی استاندارد کوئرستین محاسبه شد.

سنجش شیکوریک اسید توسط HPLC: سنجش شیکوریک اسید به روش Heimler et al. (2009) انجام

شد. بدین منظور از دستگاه HPLC (Knauer, pump K-1001) و ستونی با مشخصات (C18: ۱۲۵mm × ۴mm ID) استفاده شد. آب اسیدی حاوی فرمیک اسید یک درصد به عنوان حلال A و متانول به‌عنوان حلال B در نظر گرفته شد. گرادیان شامل ۵ درصد از حلال B که طی ۲۵ دقیقه به ۴۰ درصد حلال B در دقیقه رسید و به مدت ۵ دقیقه بصورت ایزوکراتیک ادامه یافت. میزان ۲۰ میکرولیتر از عصاره‌ی گیاهی در هر بار تزریق استفاده شد. میزان ماده‌ی شیکوریک اسید در ریشه‌های شاهد و ریشه‌های مویین القا شده در محیط کشت حاوی غلظت ۱x و ۰/۵x پتاسیم فسفات و با استفاده از منحنی استاندارد رسم شده به وسیله شیکوریک اسید استاندارد (Sigma) محاسبه گردید.

تایید مولکولی ریشه‌های مویین: به منظور تایید مولکولی درج ناحیه‌ی T-DNA موجود در پلاسمید القا کننده‌ی

ریشه‌ی A. rhizogenes محتوای ژنتیکی ریشه‌های مویین احتمالی با استفاده از روش CTAB استخراج گردید (Doyle and Doyle 1987). برای تایید وجود ژن باکتریایی در ریشه‌های مویین، از آغازگرهای اختصاصی ژن roIB (ATGGATCCCAAATTGCTATTCCCCACGA) استفاده گردید و واکنش PCR با هدف تکثیر ژن roIB انجام

شد. همچنین از پرایمر VirD نیز با توالی 5'- ATGTGCAAGGACGTAAGCCGA-3' و 5' شامل GGAGTCTTTCAGCATGGAGCAA برای تکثیر قطعه‌ای به طول ۴۳۸ bp استفاده شد. برنامه‌ی PCR شامل واسرشتگی اولیه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت پنج دقیقه و ۳۰ چرخه به صورت واسرشتگی در ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه، اتصال آغازگرها در ۵۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۵ ثانیه و بسط به مدت ۱ دقیقه و ۳۰ ثانیه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد و بسط نهایی در ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه بود. محصولات PCR بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد با ولتاژ ۸۵ بارگذاری شد. محصولات PCR پس از الکتروفورز در ژل آگارز ۱/۲ درصد در دستگاه ژل داک عکس‌برداری شدند.

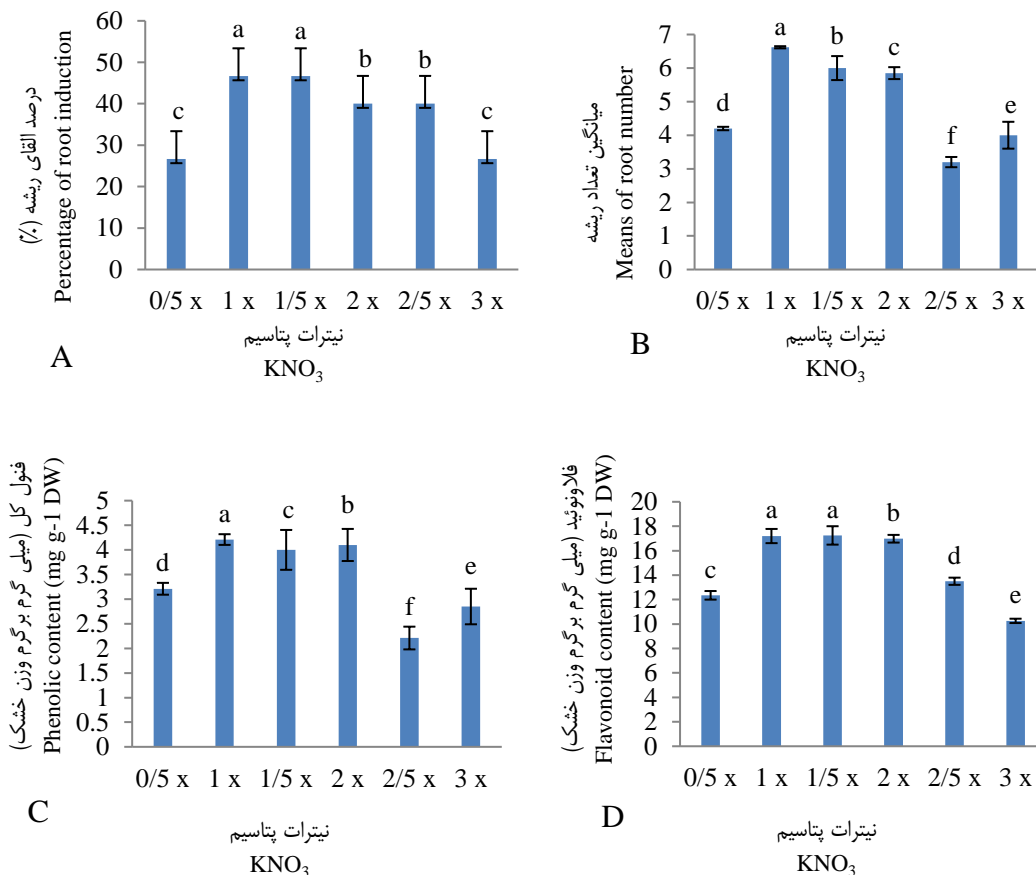
ارزیابی رشد لاین‌های ریشه مویین: برای ارزیابی لاین‌های ریشه‌های مویین از نظر میزان رشد، تعداد ۱۵ لاین مختلف ریشه مویین از ریزنمونه‌های مختلف انتخاب شد. لازم به ذکر است که لاین‌های تراریخته مستقل از هم انتخاب شدند و مبنای انتخاب، استفاده از لاین‌های ریشه مویین با محل القای متفاوت بر روی ریزنمونه‌ها بود. به‌طور طبیعی چنین لاین‌هایی با احتمال بسیار بالا از نظر تعداد نسخه‌های تراژن و محل درج آن‌ها از هم متفاوت بوده، از اینرو لاین‌های تراریخته مستقل از هم به حساب می‌آیند. ریشه‌های مویین انتخاب شده در محیط کشت MS مایع کشت شدند. پس از چهار هفته، وزن تر و وزن خشک برای هر لاین اندازه‌گیری شد و داده‌ها تجزیه و تحلیل شدند.

تأثیر غلظت‌های مختلف NAA و منبع کربن و بر کشت ریشه‌های مویین: در این آزمایش ریشه‌های به‌دست آمده از لاین برتر به عنوان ماده‌ی آزمایشی استفاده شدند. نوک ریشه‌ها به قطعاتی به طول دو سانتی‌متر برش داده شدند زیرا قطعات کوچک‌تر ریشه، هوادهی بهتری در شیکر داشته و رشد بیشتری خواهند داشت. در هر تکرار ۵۰ میلی‌گرم ریشه در ۱۵ میلی‌لیتر محیط کشت MS مایع در ظروف شیشه‌ی مریبا کشت گردید. هورمون NAA در چهار غلظت (۰، ۰/۵، ۱ و ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر) و ساکارز به عنوان منبع کربن برای رشد ریشه‌های مویین در چهار غلظت (۳، ۴، ۵ و ۶ درصد) به تنهایی یا به صورت ترکیب مورد استفاده قرار گرفتند. پس از کشت، شیشه‌ها در شیکر با دور ۱۰۰ rpm نگهداری شدند. بعد از چهار هفته، وزن تر ریشه‌ها اندازه‌گیری شد.

آنالیز آماری داده‌ها: آزمایش مربوط به بررسی تأثیر ترکیبات محیط کشت بر میزان القای ریشه‌های مویین، آزمایش مربوط به تأثیر نوع لاین‌های ریشه‌های مویین بر میزان زیست‌توده و تأثیر هورمون NAA و منبع کربن، همگی به صورت طرح کاملاً تصادفی انجام گردید. داده‌ها قبل از تجزیه و تحلیل، از نظر نرمال بودن بررسی شدند. مقایسه‌ی میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون چند دامنه‌ای دانکن انجام شد.

نتایج و بحث

تأثیر سطوح مختلف نیترات پتاسیم بر القای ریشه‌های موپین: اولین ریشه‌های موپین پس از گذشت ۱۰ روز در ریزنمونه‌های برگ مشاهده گردید. ریزنمونه‌های تراریخته، ریشه‌های طویل با انشعابات زیاد تولید کردند در حالی که ریزنمونه‌های غیر تراریخته درصد ریشه‌دهی پایین داشته و با تاخیر ظاهر شدند (شکل ۱۱). نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم نیترات بر میزان القای ریشه‌های موپین، میانگین تعداد ریشه‌ها، میزان فنول و فلاونوئید کل در شکل ۱ نشان داده شده است. بیشترین درصد القای ریشه‌های موپین (۴۶/۶۶ درصد) و میزان فلاونوئید کل (۱۷/۲۵ و ۱۷/۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی ۱X و ۱/۵X پتاسیم نیترات مشاهده شد (شکل ۱ A و B). همچنین بیشترین میانگین تعداد ریشه (۶/۶۲) و فنول کل (۴/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی ۱X پتاسیم نیترات به دست آمد (شکل ۱ C و D). با افزایش میزان پتاسیم نیترات از ۰/۵X به ۱X و ۱/۵X میزان پذیرش گیاه برای تراریختی توسط باکتری و احتمالاً توانایی باکتری در درج و بیان ژن‌های خود در سلول‌های محل زخم گیاه افزایش یافته است. اما با افزایش پتاسیم نیترات از غلظت ۱/۵X به بالاتر، درصد القای ریشه‌های موپین کاهش یافت بنابراین می‌توان گفت که غلظت‌های بالای نیترات پتاسیم تأثیر مهارکننده بر القای ریشه‌های موپین در کاسنی و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های موپین این گیاه دارد (Young-Amet al. 2000). نیتروژن از جمله عناصر ضروری برای رشد رویش گیاهان دارد و به صورت نیترات و آمونیوم وجود دارد. شکل قابل استفاده‌ی نیتروژن برای گیاهان، نیترات است که از طریق سلول‌های گیاه جذب شده و بر فرآیندهای مختلف مربوط به رشد گیاه تأثیر مثبت دارد (Shanjani 2003). در این پژوهش سطوح کمتر نیترات پتاسیم (۰/۵X) باعث کاهش القای ریشه‌های موپین (۲۶/۶۶ درصد)، میانگین تعداد ریشه (۴/۲)، میزان فنول کل (۲۱/ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ۳) و فلاونوئید کل (۳۵/ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک ۱۲) شد اما در پژوهشی که توسط Shirin et al. (2015) انجام شد بیشترین میانگین تعداد شاخساره در گیاه آکاسیا (*Saraca asoca*) در محیط کشت حاوی نیترات پتاسیم به غلظت یک چهارم میزان آن در محیط کشت MS پایه به دست آمد که نشان از تفاوت موجود در شرایط متابولیکی گیاهان مختلف دارد. همچنین در گیاه *Prosopis alba* نیز بیشترین تولید شاخه در سطوح پایین نیتروژن حاصل شد (Tabone et al. 1986). همچنین Fathi et al. (2019) گزارش کردند که برخی سویه‌های *A. rhizogenes* در محیط کشت حاوی سطوح پایین نیتروژن عملکرد بهتری در تراریخته‌سازی گیاه کاسنی دارند و برخی سویه‌ها نیز از جمله ATCC15834 بیشترین توانایی تراریخته‌سازی را در محیط حاوی مقادیر پایین فسفر دارند که به دلیل تفاوت در ساختار و عملکرد سویه‌های مختلف این باکتری است.

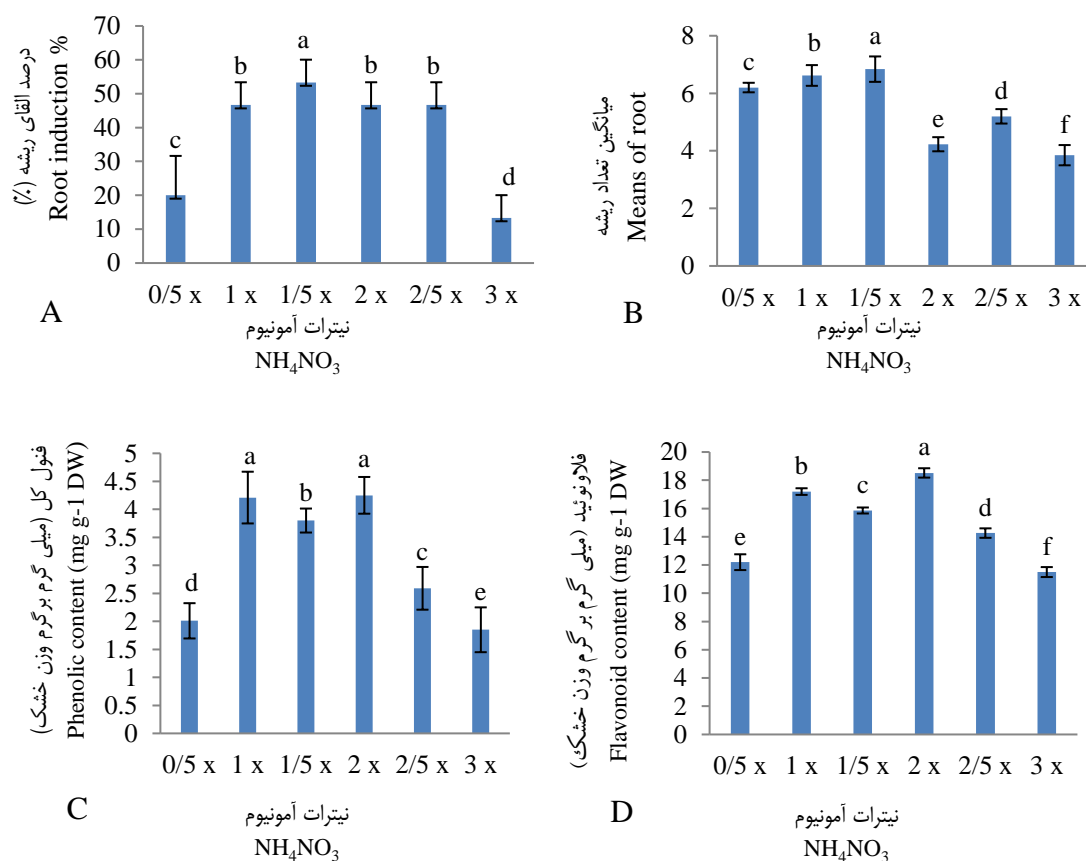


شکل ۱. تأثیر غلظت‌های مختلف نیتрат پتاسیم بر صفات ریشه‌های موپین
Figure 1. The effects of different concentration of KNO₃ on hairy root characteristics

تأثیر سطوح مختلف نیترات آمونیوم بر القای ریشه‌های موپین: نتایج بررسی تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات

آمونیم (۰/۵، ۱، ۱/۵، ۲، ۲/۵ و ۳ برابر میزان آن‌ها در محیط کشت) بر القای ریشه‌های موپین در کاسنی نشان داد که این نمک تأثیر مستقیم بر صفات مورد بررسی دارد. بیشترین میزان القای ریشه‌های موپین (۵۳/۳۳ درصد)، میانگین تعداد ریشه (۶/۸۴ عدد) در محیط کشت حاوی ۱/۵X نیترات آمونیوم به‌دست آمد و بیشترین میزان فنول (۴/۲۵ و ۴/۲۱ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار محیط کشت حاوی نیترات آمونیوم ۱X و ۲X حاصل شد و بیشترین میزان فلاونوئید کل (۱۸/۵۲ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در تیمار محیط کشت حاوی نیترات آمونیوم ۲X حاصل شد (شکل ۲ A، B، C و D). در تمام صفات اندازه‌گیری شده، کمترین مقدار در درصد القای ریشه‌های موپین (۱۳/۳۳ درصد)، میانگین تعداد ریشه‌ها (۳/۸۵ عدد)، فنول کل (۱/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و فلاونوئید (۱۱/۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) مربوط به غلظت ۳X نیترات آمونیوم بود که نشان از اثر سمیت غلظت بسیار بالای این نمک است (شکل ۲). نیترات آمونیوم نیز از منابع نیتروژن مورد نیاز گیاه بوده و از طریق افزایش تولید پلی‌آمین‌ها (Chen et al. 2011) در افزایش تولید متابولیت‌های ثانویه و افزایش سنتز مواد دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی نقش

دارد (Shehata et al. 2014). همچنین اثبات شده است که سطوح بالای آمونیوم در اندام زایی و زنده‌مانی بافت‌های گیاهی نقش دارد (Alturki et al. 2010). Fan et al. (1998) نیز گزارش کردند که افزایش آمونیوم باعث افزایش سنتز شیکمیک‌اسید شد اما برخلاف نتایج به‌دست آمده، در پژوهشی اثبات شد که غلظت‌های پایین نیترات آمونیوم تأثیر مثبتی در افزایش تولید جنسینوزید در گیاه جینسنگ شده است (Zhong and Wang 1998).



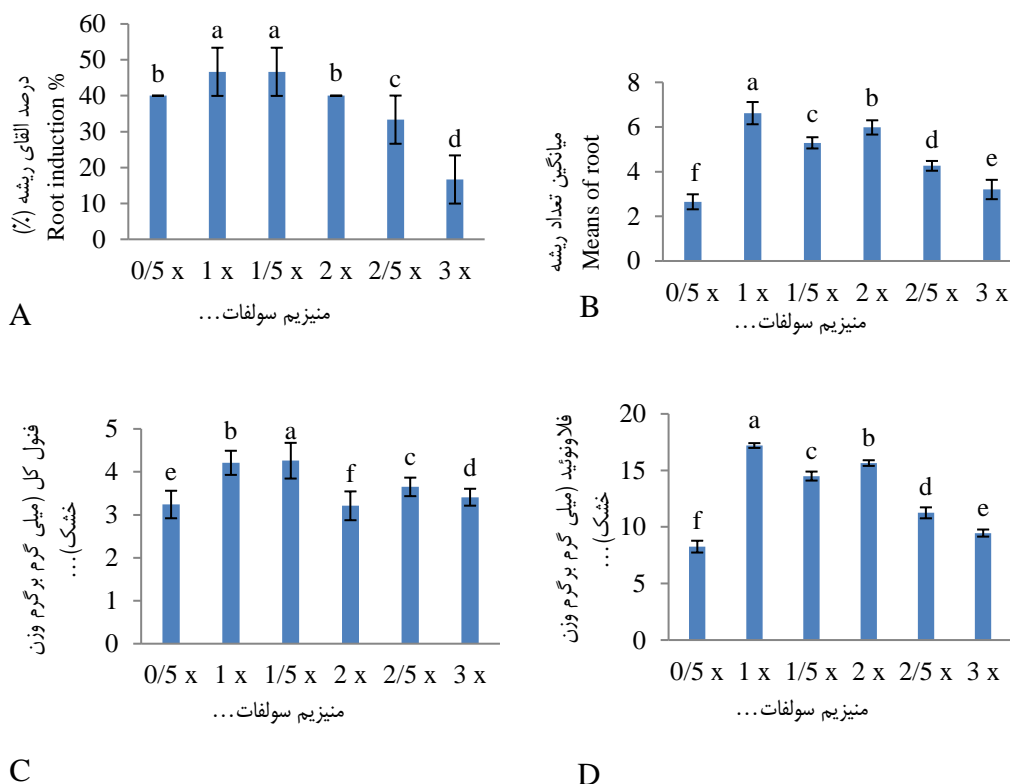
شکل ۲. تأثیر غلظت‌های مختلف نیترات آمونیوم بر صفات ریشه‌های مویین

Figure 2. The effects of different concentration of NH₄NO₃ on hairy root characteristics

تأثیر سطوح مختلف منیزیم سولفات بر القای ریشه‌های مویین: برطبق شکل ۳ تأثیر محیط کشت‌های حاوی

سطوح مختلف منیزیم سولفات بر میزان القای ریشه‌های مویین، میانگین تعداد ریشه‌ها، میزان فنول کل و فلاونوئید کل بررسی گردید. در محیط کشت حاوی ۱x و ۱/۵x منیزیم سولفات بیشترین درصد القای ریشه‌های مویین (۴۶/۶۶ درصد) مشاهده شد (شکل ۳ A) همچنین بیشترین میانگین تعداد ریشه (۶/۶۲ عدد) در تیمار ۱x به‌دست آمد (شکل ۳ B). بیشترین میزان فنول (۴/۲۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی ۱/۵x منیزیم سولفات به‌دست آمد (شکل ۳ C). همچنین غلظت ۱x

موجب تولید بیشترین میزان فلاونوئید (۱۷/۲ میلی گرم بر گرم وزن خشک) شد (شکل ۳ D). بنابراین می توان نتیجه گرفت که غلظت ۱x و ۱/۵x برای بهینه سازی القای ریشه های موین و تولید متابولیت های ثانویه مناسب است. تا به حال پژوهش های اندکی در مورد تأثیر غلظت های مختلف منیزیم سولفات بر میزان القای ریشه های موین و رشد ریشه ها و تولید متابولیت های ثانویه انجام شده است. در پژوهشی که در مورد القای ریشه های موین و تولید هیوسیامین و اسکوپولامین در گیاه شاییزک انجام شد نتایج به دست آمده نشان داد که بیشترین افزایش وزن تر ریشه ها در محیط کشت حاوی سطوح بالای منیزیم سولفات به دست آمد و میزان هیوسیامین در اثر استفاده از ۱۲۵ میلی گرم منیزیم سولفات بیشترین مقدار بود و بیشترین سطح اسکوپولامین در تیمار هزار میلی گرم منیزیم سولفات مشاهده شد (Hank et al. 2003). در کشت ریشه های موین گیاه سرخارگل نیز بیشترین میزان تجمع زیست توده و تولید متابولیت های ثانویه در محیط کشت حاوی ۱۶۰۰ میلی گرم در لیتر منیزیم سولفات به دست آمد (Abdoli et al. 2013). در کشت ریشه های موین گیاه تنباکوی هندی، بیشترین میزان تولید بیوماس در محیط کشت B5 حاوی یک گرم در لیتر منیزیم سولفات حاصل شد همچنین تولید متابولیت لوبلین در محیط کشت حاوی ۷۵ میلی گرم در لیتر کلسیم کلرید، بیشترین مقدار (۳۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک) را داشت. آن ها در نهایت گزارش کردند که ترکیب بهینه از مواد غذایی برای تولید لوبلین (Lobeline)، محیط کشت B5 پایه به همراه ۱۰۰۰ میلی گرم منیزیم سولفات است (Balvanyos et al. 2003).



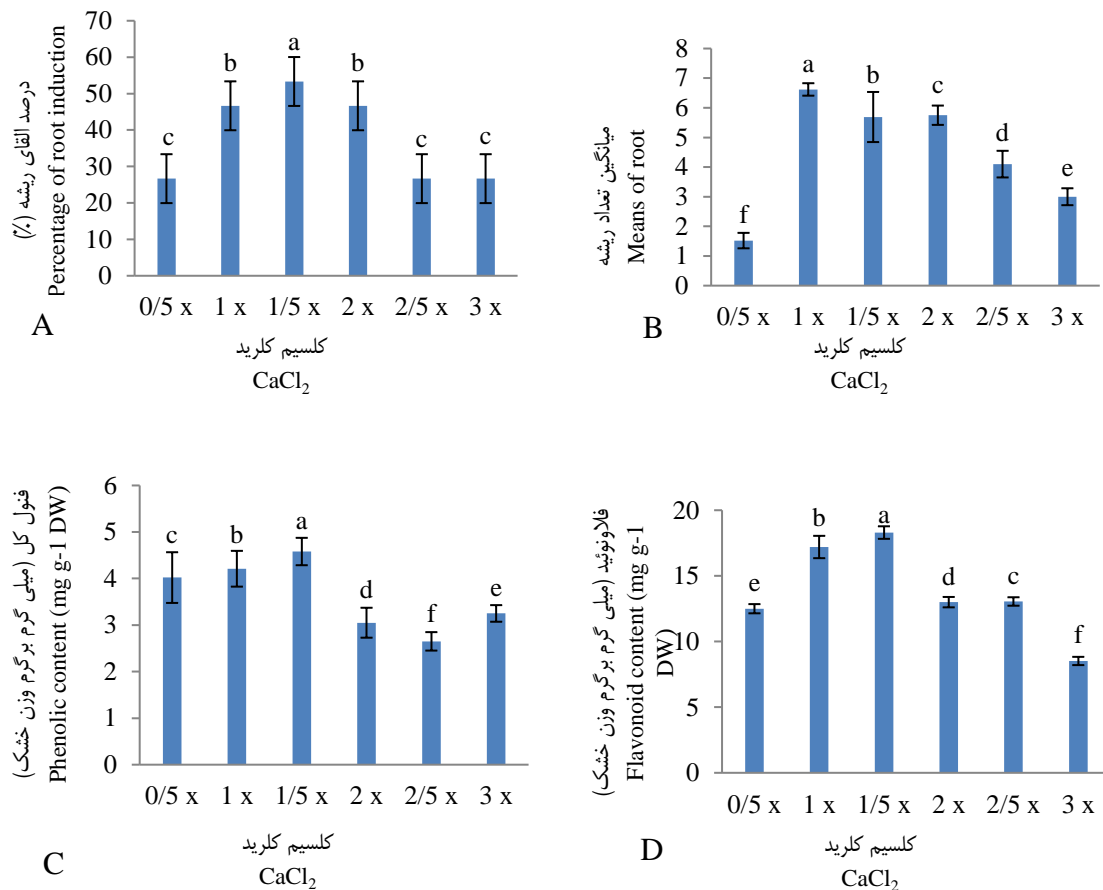
شکل ۳. تأثیر غلظت های مختلف منیزیم سولفات بر صفات ریشه های موین
Figure 3. The effects of different concentration of MgSO₄ on hairy root characteristics

تأثیر سطوح مختلف کلسیم کلرید بر القای ریشه‌های موین: تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید بر صفات

مختلف ریشه‌های موین کاسنی نشان داد که غلظت‌های ۱X، ۱/۵X و ۲X با ۴۶/۶۶، ۵۳/۳۳ و ۴۶/۶۶ درصد القای ریشه‌های موین، بیشترین تأثیر را نسبت به غلظت‌های بالاتر و پایین‌تر داشتند (شکل ۴ A). بیشترین میانگین تعداد ریشه (۶/۶۲ عدد) نیز در محیط کشت حاوی غلظت ۱X کلسیم کلرید حاصل شد (شکل ۴ B). میزان فنول کل در سه تیمار ۰/۵X، ۱X و ۱/۵X به ترتیب با ۴/۰۲، ۴/۱ و ۴/۵۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بیشتر از غلظت‌های ۲X، ۱/۵X و ۳X بود (شکل ۴ C) که نشان از اثرات منفی غلظت‌های بالای این نمک دارد. بیشترین میزان فلاونوئید نیز در غلظت‌های ۱X و ۱/۵X با میانگین ۱۷/۲ و ۱۸/۳ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک بود (شکل ۴ D). افزایش غلظت کلسیم کلرید در محیط کشت موجب افزایش آنزیم پراکسیداز در گیاه و تجزیه‌ی متابولیت‌های ثانویه می‌گردد (Ajungla et al 2009) لذا در این پژوهش نیز میزان تولید متابولیت‌های ثانویه در محیط کشت حاوی سطوح بالای کلسیم کلرید کم بود همانطور که در پژوهش Abdoli et al. (2013) نیز اثر منفی سطوح بالای کلسیم کلرید در رشد ریشه‌های موین گیاه سرخارگل اثبات شد. در مطالعه‌ی گزارش شد که محیط کشت دارای مقادیر بالای کلسیم کلرید موجب کاهش رشد و زرد شدن بافت گیاه پروانش در شرایط کشت درون‌شیشه‌ای گردید (Siddiqui and Mujib 2012). همچنین مقدار ۱۰۰ میلی‌گرم در لیتر کلسیم کلرید در محیط کشت استقرار گیاه *Brugmansia candida* نیز موجب نتیجه‌ی مشابه شد (Pitta Alvarez et al 2000).

تأثیر سطوح مختلف پتاسیم فسفات بر القای ریشه‌های موین: نتایج مقایسه‌ی تأثیر سطوح مختلف پتاسیم

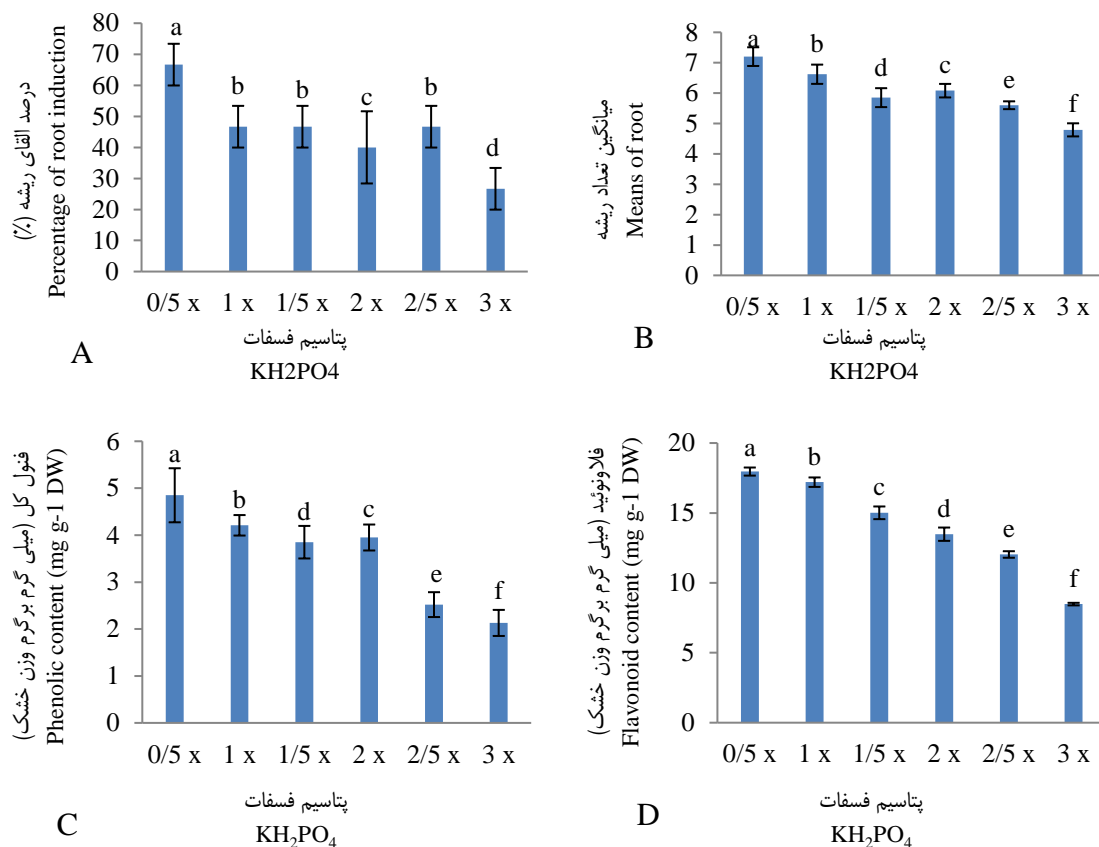
نیترات بر القای ریشه‌های موین در گیاه کاسنی نشان داد که محیط کشت حاوی ۰/۵X پتاسیم فسفات بیشترین میزان القای ریشه‌های موین (۶۶/۶۶ درصد)، میانگین تعداد ریشه (۷/۲ عدد)، میزان فنول کل (۴/۸۵ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) و فلاونوئید کل (۱۷/۹۶ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را داشت. کمترین درصد القای ریشه‌های موین (۲۶/۶۶)، میانگین تعداد ریشه (۴/۷۹ عدد)، میزان فنول کل و فلاونوئید (به ترتیب ۲/۱۳ و ۸/۴۸ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در محیط کشت حاوی پتاسیم فسفات ۳X مشاهده شد (شکل ۵ A، B، C و D). که نشان از ایجاد سمیت فسفات است. نتایج بررسی میزان شیکوریک اسید در ریشه‌های شاهد غیر تراریخته، ریشه‌های موین القا شده در محیط کشت MS حاوی غلظت ۱X و ۰/۵X پتاسیم فسفات نشان داد که بیشترین محتوای شیکوریک اسید (۲۴/۶۹ میلی‌گرم بر گرم وزن تر) در غلظت ۰/۵X پتاسیم فسفات حاصل شد (شکل ۶). فسفر در بسیاری از فرآیندهای گیاهی از جمله فتوسنتز، ذخیره‌ی انرژی و تقسیم سلول‌های گیاهی نقش مؤثری دارد اما در تعدادی از پژوهش‌ها گزارش شده که فسفر تأثیر منفی در تراریخته‌سازی گیاه توسط *A. rhizogenes* دارد (Azadi et al 2010) و محدود کردن میزان فسفات محیط کشت گیاهی موجب افزایش فعالیت ژن بیماری‌زای Vir در گیاه و افزایش درصد القای ریشه‌های موین شده است (Palmer et al 2004).



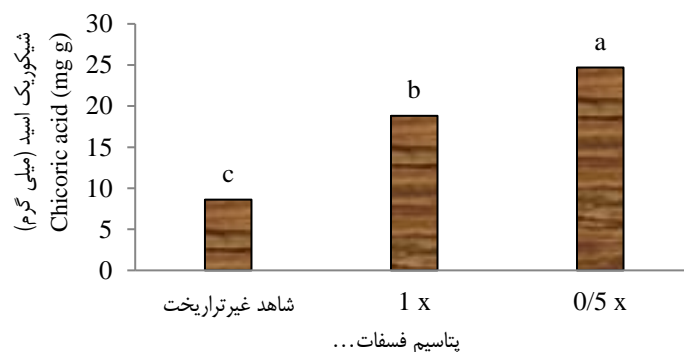
شکل ۴. تأثیر غلظت‌های مختلف کلسیم کلرید بر صفات ریشه‌های مویین

Figure 4. The effects of different concentration of CaCl₂ on hairy root characteristics

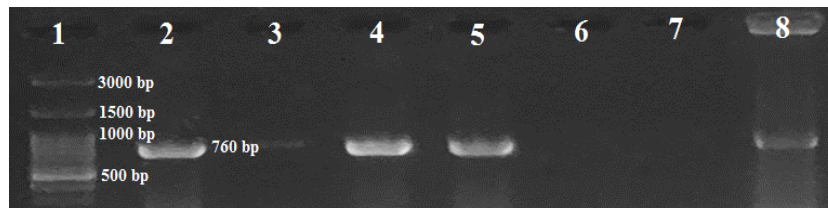
از طرفی Danhorn et al. (2004) گزارش کردند که حذف فسفات از محیط کشت موجب افزایش توانایی rhizogenes در اتصال به گیاه میزبان و انتقال ناحیه‌ی موسوم به T-DNA از باکتری به ژنوم گیاه می‌شود. در مقابل، Kahrizi et al. (2017) نیز در پژوهشی گزارش کردند که سطوح بالای پتاسیم فسفات در محیط کشت موجب افزایش ربادیوزید در گیاه استویا گردید. برای تأیید تراریختی ریشه‌های مویین، از واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با استفاده از آغازگرهای ژن rolB استفاده شد. با توجه به این که طول توالی تکثیرشونده با این آغازگر ۷۶۰ bp می‌باشد، تکثیر قطعه‌ای با این مشخصات در گیاهان تراریخت حضور حداقل یک نسخه از ژن را در آن‌ها تأیید می‌کند. قطعه مورد نظر در باکتری به‌عنوان کنترل مثبت تکثیر شد و ریشه‌ی شاهد به‌عنوان کنترل منفی تکثیری نشان نداد. همچنین پرایمر virD نیز تکثیری نشان نداد که نشانه‌ی عدم وجود آلودگی سطحی rhizogenes A در سطح ریشه‌ها است (شکل ۷).



شکل ۵. تأثیر غلظت‌های مختلف پتاسیم فسفات بر صفات ریشه‌های موئین
Figure 5. The effects of different concentration of KH₂PO₄ on hairy root characteristics



شکل ۶. مقایسه میانگین تأثیر غلظت پتاسیم فسفات بر میزان شیکوریک اسید در ریشه‌های موئین
Figure 6. Mean comparison of the effect of KH₂PO₄ concentration on chicoric acid content in hairy roots

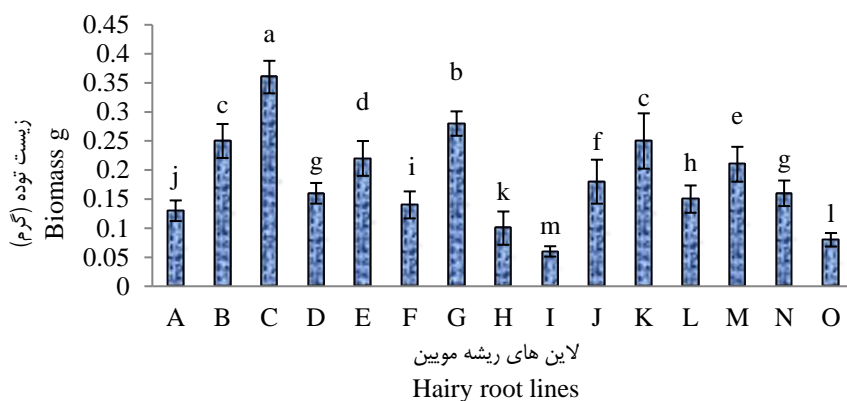


شکل ۷. تکثیر قطعه‌ی DNA به اندازه‌ی ۷۶۰ bp در واکنش PCR با آغازگرهای اختصاصی ژن rolB بر روی DNA ریشه‌های مویین: ۱: نشانگر اندازه‌ی DNA ۱۰۰ جفت بازی، ۲-۵: ریشه‌های مویین، ۶: ریشه‌های شاهد حاصل از ریزنمونه‌های غیرتراریخت به عنوان شاهد منفی، ۷: پرایمر virD، ۸: پلاسמיד باکتری *A. rhizogenes* به عنوان شاهد مثبت

Figure 7. PCR amplified DNA fragments (760 bp) using specific primers for rolB gene of *A. rhizogenes* on chicory hairy root DNA. 1: 100 bp DNA Ladder, 2-5: hairy roots, 6: Adventitious root raised from non-transformed explant as negative control, 7: virD primer, 8: *A. rhizogenes* plasmid as positive control

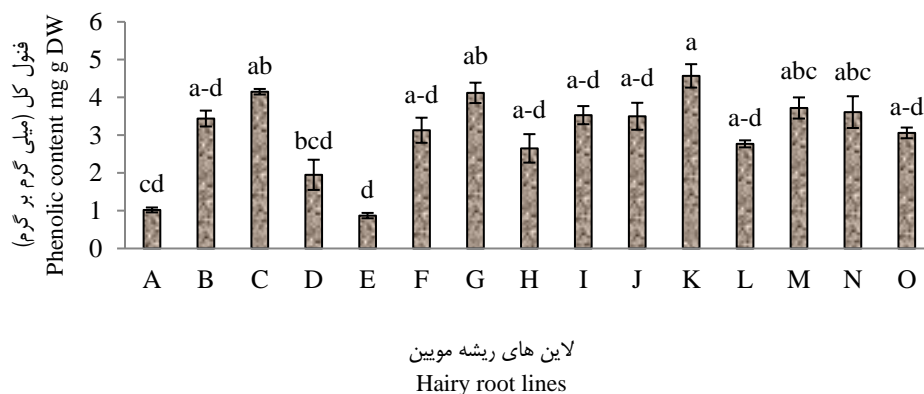
ارزیابی رشد لاین‌های ریشه مویین: برای این آزمایش از ریشه‌های حاصل از غلظت ۰/۵X پتاسیم فسفات استفاده شد. ریشه‌ها از ریزنمونه‌ها جدا شد و ۱۵ لاین ریشه به طور جداگانه در محیط کشت مایع کشت گردید. لاین‌های مورد نظر نسبت به همدیگر تفاوت معنی‌داری را در میزان رشد و افزایش زیست‌توده نشان دادند. این تفاوت به علت درج تصادفی باکتری و میزان بیان متفاوت ژن باکتریایی در ریزنمونه‌های مختلف است. بیشترین میزان زیست‌توده در لاین C (۰/۳۶ گرم) بدست آمد و کمترین میزان زیست‌توده در لاین I ریشه‌های مویین (۰/۰۶ گرم) مشاهده گردید (شکل ۸). همچنین بیشترین محتوای فنول کل (۴/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در لاین K مشاهده شد و کمترین میزان فنول کل (۰/۸۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) در لاین E به دست آمد (شکل ۹). در این پژوهش تنوع زیادی از لحاظ میزان رشد در بین لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین مشاهده شد که احتمالاً به علت تنوع در تعداد نسخه‌های T-DNA درج شده در ژنوم گیاه و همچنین میزان بیان ژن انتقال یافته می‌باشد (Bathoju et al 2017). همچنین طبق مشاهدات معلوم شد که همبستگی کاملی بین میزان زیست‌توده و فنول کل وجود ندارد به‌طور مثال لاین C بیشترین میزان افزایش زیست‌توده را داشت اما بیشترین میزان فنول کل به آن متعلق نیست. در پژوهشی میزان متابولیت‌های ثانویه در ۸ لاین مختلف ریشه‌های مویین گیاه گل راعی بررسی شد و نتایج به دست آمده نشان داد که میزان فلاونوئید در بین لاین‌ها از ۱/۴ در لاین D تا ۴/۷ میلی‌گرم بر گرم در لاین E متغییر بود (Nigutova et al 2016). نتایج پژوهش Hezelyov et al. (2018) نشان داد که تعداد نسخه‌های ژن rolC در لاین‌های مختلف ریشه‌های مویین از ۱/۰۱ در لاین اول تا ۷/۱۸ نسخه در لاین هفتم متفاوت بود. این تفاوت با نتایج حاصل از پژوهش حاضر مطابقت داشت و نشان از درج

تصادفی و متفاوت T-DNA باکتری در ژنوم گیاهان است. در آزمایش بررسی تاثیر هورمون NAA و منبع کربن، مقایسه‌ی میانگین داده‌ها نشان داد که بیشترین وزن تر ریشه‌های مویین (۱/۹۶ و ۱/۷۲ گرم در فلاسک) به ترتیب در ریشه‌های رشد کرده در محیط کشت حاوی ۱/۵ میلی‌گرم در لیتر NAA و ۳ درصد و ۴ درصد ساکارز به‌دست آمد (شکل ۱۰). نتایج تحقیقات نشان می‌دهد استفاده از تنظیم کننده‌های رشد گیاهی تاثیر مثبتی بر روی رشد ریشه‌های مویین نسبت به ریشه‌های غیر تراخیخت (شاهد) دارد. و این امر به علت انشعابات زیاد ریشه‌های مویین و قابلیت جذب بهینه‌ی هورمون‌ها می‌باشد. در پژوهشی تاثیر تنظیم کننده‌های رشد را بر روی رشد ریشه‌های مویین بررسی کرده و گزارش کردند که NAA بیشترین تاثیر را در رشد و تولید متابولیت‌های ثانویه در ریشه‌های مویین گیاه *Plumbago indica* نسبت به جیبرلیک اسید، ایندول استیک اسید (IAA) و ایندول بوتیریک اسید (IBA) داشته است (Gangopadhyaya et al 2011).



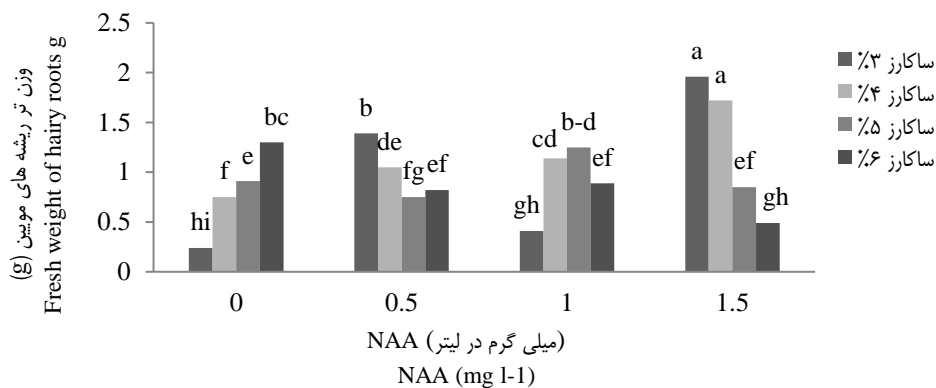
شکل ۸. مقایسه‌ی زیست توده در لاین‌های ریشه‌های مویین

Figure 8. Comparison of biomass in hairy root lines



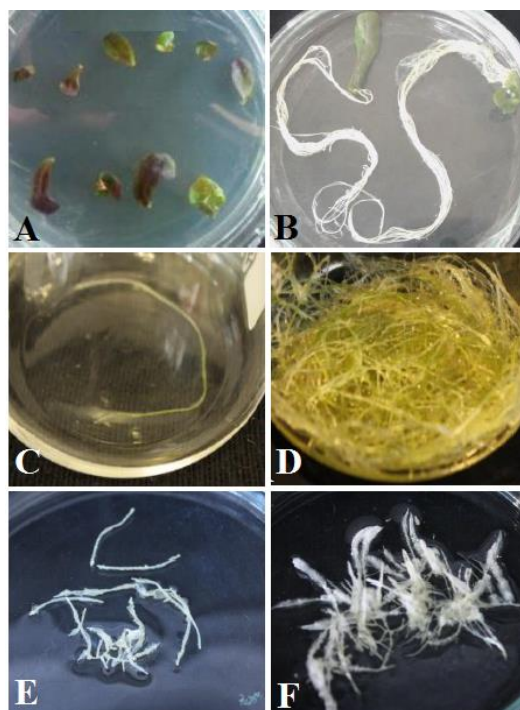
شکل ۹. مقایسه‌ی میزان فنول در لاین‌های ریشه‌های مویین

Figure 9. Comparison of phenolic content in hairy root lines



شکل ۱۰. مقایسه‌ی تأثیر NAA و منبع کربن بر میزان زیست‌توده در ریشه‌های موپین

Figure 10. Comparison of the effect of NAA and carbon source on biomass of hairy root



شکل ۱۱. القای ریشه‌های موپین توسط *A. rhizogenes* در گیاه کاسنی. A: ریزنمونه‌های غیر تراریخت به‌عنوان شاهد، B: ریزنمونه‌های تراریخته شده توسط *A. rhizogenes*، C: رشد ریشه‌های شاهد در محیط کشت مایع، D: رشد ریشه‌های موپین در محیط کشت مایع، E: رشد لاین کم‌رشد ریشه‌های موپین، F: رشد لاین پررشد ریشه‌های موپین

Figure 11. Hairy roots induction by *A. rhizogenes* in Chicory, A: Non-transformed explants as control, B: The explants Transformed by *A. rhizogenes*, C: Control root growth in liquid medium D: Hairy root growth in liquid medium, E: The grow of low growing hairy root lines, F: The grow of fast growing hairy root lines

نتیجه‌گیری: نتایج کلی آزمایش‌ها نشان داد که القای ریشه‌های موئین و تولید متابولیت‌های ثانویه در کاسنی تحت تأثیر ترکیبات محیط کشت قرار دارد. بیشترین درصد القای ریشه‌های موئین در غلظت ۱X پتاسیم نیترات، ۱/۵X نیترات آمونیوم، ۱X و ۱/۵X منیزیم سولفات، ۱/۵X کلسیم کلرید و ۰/۵X پتاسیم فسفات به‌دست آمد که نشان می‌دهد بیشتر عناصر در غلظت برابر با میزان آن در محیط کشت MS پایه یا ۱/۵ برابر آن بیشترین کارایی را در تراریخته‌سازی گیاه کاسنی دارند. به استثنای نمک KH_2PO_4 که غلظت بهینه‌ی آن، ۰/۵ برابر میزان آن در محیط کشت MS پایه و در این تیمار بالاترین درصد القای ریشه‌های موئین و محتوای فنول کل به‌دست آمد. بیشترین میزان فنول کل در هر تیمار، در غلظت ۱X پتاسیم نیترات، ۲X نیترات آمونیوم، ۱/۵X منیزیم سولفات، ۱/۵X کلسیم کلرید و ۰/۵X پتاسیم فسفات به‌دست آمد. غلظت ۱/۵X پتاسیم نیترات، ۲X نیترات آمونیوم، ۱X منیزیم سولفات، ۱/۵X کلسیم کلرید و ۰/۵X پتاسیم فسفات نیز بالاترین میزان فلاونوئید را داشتند. به‌منظور بررسی تفاوت احتمالی در توان رشدی و تجمع متابولیت‌ثانویه در لاین‌های مختلف ریشه موئین، ۱۵ لاین پر رشد این ریشه‌ها در محیط کشت مایع مورد آزمون قرار گرفتند. لاین‌های مختلف، میزان تجمع زیست‌توده و متابولیت متفاوتی نشان دادند و لاین C بیشترین افزایش زیست‌توده (۰/۳۶ گرم) و لاین K بیشترین میزان فنول (۴/۵۷ میلی‌گرم بر گرم وزن خشک) را نشان دادند. با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش می‌توان گفت که سیستم کشت ریشه‌های موئین، به‌واقع رهیافت مفید و کارآمد برای بهینه‌سازی تولید ترکیبات دارویی گیاهان در سطح وسیع و استفاده از آن‌ها در صنایع داروسازی و سلامت می‌باشد.

سپاسگزاری

نگارندگان از همکاری گروه علوم باغبانی دانشکده‌ی کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه محقق اردبیلی کمال تشکر را دارند.

منابع

- فتحی رقیه؛ محب الدینی مهدی؛ چمنی اسماعیل (۱۳۹۷) بهینه‌سازی القای ریشه‌های موئین در کاسنی (Cichorium intybus L.) و تأثیر اکسین و منبع کربن بر رشد آن‌ها. علوم باغبانی ایران ۳(۹۴)، ۶۶۷-۶۵۷.
- کیبیرنتاج سارا؛ ذوالعلی جعفر؛ نعمت زاده قربانعلی؛ شکری احسان (۱۳۹۱) بهینه‌سازی شرایط القا و تثبیت کشت ریشه‌های موئین گیاه کاسنی (Cichorium intybus) حاصل از تلقیح آگروباکتريوم رایزوژنز. مجله‌ی بیوتکنولوژی کشاورزی ۲(۴)، ۶۱-۷۵.
- مرادی فاطمه؛ زارع مهرجردی محبوبه؛ وحدتی کوروش؛ حسنلو طاهره (۱۳۹۷) تأثیر عوامل مختلف بر القای ریشه‌های موئین در سیر ایرانی. تولیدات گیاهی (مجله علمی کشاورزی) ۱(۱۴)، ۵۴-۴۳.

References

- Abdoli M, Moieni A, Naghdi Badi H (2013) Influence of KNO₃, CaCl₂ and MgSO₄ concentrations on growth and cichoric acid accumulation in hairy root culture of purple coneflower (*Echinacea purpurea* L.). *J Med Plant Res* 12, 75-84.
- Ajungla L, Patil P, Barmukh R, Nikam T, (2009) Influence of biotic and abiotic elicitors on accumulation of hyoscyamine and scopolamine in root cultures of *Datura metel* L. *Indian J Biotechnol* 8, 317-322.
- Al-Turki S, Shahba MA, Stushnoff C (2010) Diversity of antioxidant properties and phenolic content of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) fruits as affected by cultivar and location. *J Food Agric Environ* 8, 253-260.
- Aycan M, Beyaz R, Bahadir A, Yildiz M (2019) The effect of magnetic field strength on shoot regeneration and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in flax (*Linum usitatissimum* L.). *Czech J Genet Plant Breed.* 55, 20-27.
- Azadi P, Chin DP, Kuroda K et al. (2010) Macro elements in inoculation and co-culture medium strongly affect the efficiency of *Agrobacterium*-mediated transformation in *Lilium*. *J Plant Cell Tissue Organ Cult* 101, 201-209.
- Azarmehr B, Karimi F, Taghizadeh M et al. (2013) Secondary Metabolite Contents and Antioxidant Enzyme Activities of *Cichorium intybus* Hairy Roots in Response to Zinc. *J medicinal plants by-products* 2, 131-138.
- Balvanyos I, Szoke E, Kursinszki L (2003) Effect of macroelements on the growth and lobeline production of *Lobelia inflata* L. hairy root cultures. *Acta Horti* 597, 245-251
- Bathoju G, Rao K, Giri A (2017) Production of sapogenins (stigmasterol and hecogenin) from genetically transformed hairy root cultures of *Chlorophytum borivilianum* (Safed musli). *Plant Cell Tissue Organ Cult* 131, 369-376.
- Chen L, Liu QQ, Gai JY et al. (2011) Effects of nitrogen forms on the growth and polyamine contents in developing seeds of vegetable soybean. *J Plant Nutr* 34, 504-521.
- Conforti F, Sosa S, Marrelli M et al. (2009) The protective ability of Mediterranean dietary plants against the oxidative damage: The role of radical oxygen species in inflammation and the polyphenol, flavonoid and sterol contents. *Food Chem* 112, 587–594.

- Danhorn T, Hentzer M, Givskov M et al. (2004) Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR–PhoB regulatory system. *J. Bacteriol* 186, 4492-4501.
- Degl innocenti E, Pardossi A, Tattini M Guidi L (2008) Phenolic compounds and antioxidant power in minimally processed salad. *J Food Biochem* 32, 642–653.
- Doyle JJ, Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19, 11-15.
- Dupre P, Lacoux Y, Neutelings G et al. (2000) Genetic transformation of *Ginkgo biloba* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Physiol Plant* 108, 413–419.
- Elkin YN, Kulesh NI, Stepanova AY et al. (2018) Methylated flavones of the hairy root culture *Scutellaria baicalensis*. *J plant physiol* 231, 277-280.
- Fan Y, Wang Y, Tan R, Zhang Z (1998) Seasonal and sexual variety of *Ginkgo flavonol glycosides* in the leaves of *Ginkgo biloba* L. *J Tradit. Chin. Med* 23, 267-269.
- Fathi R, Mohebodini M, Chamani E (2019) High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Cichorium intybus* L. via removing macronutrients. *Ind Crops Prod* 128, 572-580.
- Fathi R, Mohebodini M, Chamani E (2019) High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated genetic transformation in *Cichorium intybus* L. via removing macronutrients. *Ind Crops Prod* 128, 572-580.
- Gamborg OL, Miller RA, Ojima K (1968) Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res* 50, 151-158
- Gangopadhyaya M, Dewanjeeb S, Chakrabortyc D, Bhattacharyaa S (2011) Role of exogenous phytohormones on growth and plumbagin accumulation in *Plumbago indica* hairy roots and conservation of elite root clones via synthetic seeds. *Ind Crops Prod* 33, 445-450.
- Hank H, Laszlo I, Balvanyos I, et al. (2003) Effect of magnesium on the growth and alkaloid production of hairy root cultures. *Acta Hort* 597, 271-274.
- Heimler D, Isolani L, Vignolini P, Romani A (2009) Polyphenol content and antiradical activity of *Cichorium intybus* L. from biodynamic and conventional farming. *Food Chem* 114, 765–770.

- Henzelyova J, Cellarova E (2018) Modulation of naphthodianthrone biosynthesis in hairy root-derived *Hypericum tomentosum* regenerants. *Acta Physiol Plant* 40, 82.
- Kahrizi D, Ghari S, Ghaheeri M et al. (2017) Effect of KH_2PO_4 on gene expression, morphological and biochemical characteristics of *Stevia rebaudiana* Bertoni under in vitro conditions. *Mol Cell Biol* 63, 107-111.
- Kumar V, Sharma A, Narasimha Prasad BC et al. (2006) *Agrobacterium rhizogenes* mediated genetic transformation resulting in hairy root formation is enhanced by ultrasonication and acetosyringone treatment. *Electron J Biotechnol* 9, 349-357.
- Linsmaier EM, Skoog F (1965) Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 18, 100-127.
- Montoro P, Teinseree N, Rattana W et al. (2000) Effect of exogenous calcium on *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer in *Hevea brasiliensis* (rubber tree) friable calli. *Plant Cell Rep* 19, 851-855.
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15, 473-476.
- Nigutova K, Kusari S, Sezgin S et al. (2019) Chemometric evaluation of hypericin and related phytochemicals in 17 in vitro cultured *Hypericum* species, hairy root cultures and hairy root-derived transgenic plants. *J Pharm Pharmacol* 71, 46-57.
- Palmer AG, Gao R, Maresh J et al. (2004) Chemical biology of multi-host/pathogen interactions: chemical perception and metabolic complementation. *J. Annu Rev Phytopathol* 42, 439-464.
- Pereira MMA, Martins AD, Morais LC et al. (2019) The Potential of Agro-homeopathy Applied to Medicinal Plants-A Review. *J Agric Sci* 11, 215-227.
- Pitta-Alvarez SI, Spollansky TC, Giulietti AM (2000) The influence of different biotic and abiotic elicitors on the production and profile of tropane alkaloids in hairy root cultures of *Brugmansia candida*. *Enzyme Microb Technol* 26, 252-258.
- Saeed M, Abdel-Hack ME, Alagawany M et al. (2017) Chicory (*cichorium intybus*) herb: Chemical composition, pharmacology, nutritional and healthful applications. *Int J Pharmacol* 13, 351-360.

- Shanjani PS (2003) Nitrogen effect on callus induction and plant regeneration of *Juniperus excelsa*. *Int J Agric Biol* 5, 419-422.
- Sharafi A, Sohi HH, Azadi P, Sharafi AA (2014) Hairy root induction and plant regeneration of medicinal plant *Dracocephalum kotschyi*. *Physiol Mol Biol Plants* 20, 257-262.
- Shehata, WF, Aldaej MI, Alturki SM, Ghazzawy HS (2014) Effect of ammonium nitrate on antioxidants production of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) in vitro. *Biotechnol* 13, 116-125.
- Shirin F, Parihar NS, Shah SN (2015) Effect of nutrient media and KNO_3 on in vitro plant regeneration in *Saraca asoca* (Roxb.) Willd. *American J Plant Sci* 6, 3282.
- Siddiqui ZH, Mujib A (2012) Accumulation of vincristine in calcium chloride elicited *Catharanthus roseus* cultures. *J Nat Prod* 2, 307-315.
- Singh RS, Chattopadhyay T, Thakur D et al. (2018) Hairy Root Culture for In Vitro Production of Secondary Metabolites: A Promising Biotechnological Approach. In *Biotechnological Approaches for Medicinal and Aromatic Plants* 110, 235-250.
- Sonald SF, Laima SK (2019) Phenolics and cold tolerance of *Brassica napus*. *Plant Agric* 2001; 1:1-5.
- Tabone T, Felker P, Bingham R et al. (1986) Techniques in the shoot multiplication of the leguminous tree *Prosopis alba* clone B2V50. *For Ecol Manag* 16, 191-200.
- Tripathi MK, Mishra N, Tiwari S et al. (2019) Plant Tissue Culture Technology: Sustainable Option for Mining High Value Pharmaceutical Compounds. *International Int J Curr Microbiol Appl Sci* 8, 1002-1010.
- Young-Am C, Yu HS, Song JS et al (2000) Indigo production in hairy root cultures of *Polygonum tinctorium* Lour. *Biotechnol Lett* 22, 1527-1530.
- Zhong JJ, Wang SJ (1998) Effects of nitrogen source on the production of ginseng saponin and polysaccharide by cell cultures of *Panax quinquefolium*. *Process Biochem* 33, 671-675.

